

О. И. Орлова, Г. В. Каракашев, В. И. Шмурак, В. В. Абзианидзе, Е. И. Савельева

ОПРЕДЕЛЕНИЕ N7-[2-[(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)-ТИО]-ЭТИЛ]-ГУАНИНА В МОЧЕ КРЫС КАК МАРКЕРА ВОЗДЕЙСТВИЯ СЕРНИСТОГО ИПРИТА

НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Российская Федерация, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г. п. Кузьмолловский, корп. № 93

Предложена методика определения биомаркера воздействия сернистого иприта — его аддукта с ДНК, N7-[2-[(2-гидроксиэтил)-тио]-этил]-гуанина (N7-HEТЕG), методом ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией. Для разработки методики был синтезирован и очищен аналитический стандарт с содержанием основного вещества не менее 90%. Достигнутый предел определения методики составляет 5 нг/мл. Построены градуировочные зависимости содержания аддукта в линейном диапазоне 1–100 нг/мл. Методика апробирована при анализе образцов мочи крыс, экспонированных сернистым ипритом в нелетальной дозе (2 мг/кг). Библиогр. 13 назв. Ил. 10. Табл. 1.

Ключевые слова: сернистый иприт, биопробы, биомаркер, метаболит, аддукт, ДНК, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.

Для цитирования: Орлова О. И., Каракашев Г. В., Шмурак В. И., Абзианидзе В. В., Савельева Е. И. Определение N7-[2-[(2-гидроксиэтил)-тио]-этил]-гуанина в моче крыс как маркера воздействия сернистого иприта // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4 (62). Вып. 3. С. 313–325. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu04.2017.306>

O. I. Orlova, G. V. Karakashev, V. I. Shmurak, V. V. Abzianidze, E. I. Savelieva

DETERMINATION OF N7-[2-[(2-HYDROXYETHYL)THIO]-ETHYL]GUANINE IN RAT'S URINE AS BIOMARKER OF EXPOSURE OF SULFUR MUSTARD

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 93, Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, 188663, Russian Federation

A method for the determination of the sulfur mustard (SM) exposure biomarker-N7-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]-ethyl]guanine (N7-HEТЕG) by high-performance liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) was developed. An analytical standard of N7-HEТЕG was synthesized and purified ($\leq 90\%$). The limit of detection of the developed method is 1 ng/mL. The method was linearly calibrated from 1 ng/mL to 100 ng/mL. The method was further applied for the quantifications of N7-HEТЕG in rat urine exposed of SM in vivo at dosage of 2 mg/kg. Refs 13. Figs 10. Tables 1.

Keywords: sulfur mustard, biomedical samples, biomarker, metabolite, adduct, DNA, high-performance liquid chromatography.

For citation: Orlova O. I., Karakashev G. V., Shmurak V. I., Abzianidze V. V., Savelieva E. I. Determination of N7-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]-ethyl]guanine in rat's urine as biomarker of exposure of sulfur mustard. *Vestnik SPbSU. Physics and Chemistry*. 2017. Vol. 4 (62), iss. 3. P. 313–325. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu04.2017.306>

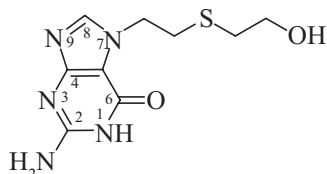
1. Введение. Сернистый иприт (СИ) является одним из наиболее изученных боевых отравляющих веществ. Он обладает выраженным кожно-нарывным действием и является сильным алкилирующим агентом [1–3]. Несмотря на то что исследование

механизмов воздействия отравляющих веществ на живые системы имеет длительную историю, лишь относительно недавно развитие приборной базы и технических возможностей аналитической химии позволило сосредоточиться на биомаркерах отдалённых последствий воздействия отравляющих веществ на организм. Известно, что СИ повреждает ДНК и активирует ряда сигнальных каскадов, большая часть которых ещё недостаточно изучена. Реагируя с нуклеофильными сайтами молекулы ДНК, СИ вызывает её алкилирование и, как следствие, опасные мутации. Исследования в данной области способствовали проникновению в суть механизма, согласно которому проявляются генотоксичные свойства отравляющих веществ, а также создали базу для оценки возможного ущерба здоровью от их воздействия и разработки плана терапии.

Несмотря на то что запасы отравляющих веществ к настоящему времени в основном уже уничтожены в соответствии с обязательствами международной конвенции, опасность воздействия СИ на человека сохраняется. Потенциальную опасность представляют террористические атаки, локальные военные конфликты, а также возможность контакта с затопленным и захороненным СИ.

Идентификация и количественное определение аддуктов СИ с ДНК имеет важное значение для оценки степени повреждения генетического материала и установления связи между образованием аддуктов и биологическим конечными показателями (мутациями, разрывами нитей ДНК и т. д.) [4–6].

Ещё в 1960-х годах авторы работ [7–9] в опытах с меченым ^{35}S -СИ установили, что главной мишенью для воздействия СИ на ДНК является N7-положение гуанина. Последующая потеря атома хлора приводит к образованию N7-гидроксиэтилтиоэтил-20-деоксигуанозина (HETE-N7dGuo), который, в свою очередь, вследствие депуринизации, превращается в свободный N7-[2-[(2-гидроксиэтил)-тио]-этил]-гуанин (N7-HETEG) [10]. Структурная формула образующегося соединения N7-HETEG приведена ниже:



На настоящий момент установлено, что алкилирование ДНК протекает по трём основным сайтам:

- 1) N7,
- 2) O6-положения в гуанине,
- 3) N3-положение в аденине.

В качестве биомаркеров воздействия СИ обычно рассматривают четыре типа аддуктов:

- 1) N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (N7-HETEG),
- 2) бис(2-этил-N7-гуанин)тиоэфир (*Bis-G*), образующийся в результате реакции по каждому положению N7 двух остатков гуанина в двухцепочечной ДНК,
- 3) N3-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-аденин (N3-HETEA),
- 4) O6-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (O6-HETEG).

По данным работы [11], образование аддуктов протекает в соответствии со следующим процентным соотношением:

- по положению N7-гуанина — 61%,

- по положению N3-аденина — 16%,
- по двум положениям N7-гуанина (межнитевая и внутрицепочечная сшивки) — около 17%,
- по положению O6-гуанина — 0,1%.

Именно по причине максимального выхода в качестве биомаркера воздействия СИ на ДНК чаще всего используют N7-НЕТЕГ. Его биоаналитическая значимость ограничена химической нестабильностью, а также тем, что он не участвует в спаривании оснований по Уотсону—Крику [12]. Тем не менее этот аддукт в количественном отношении значительно преобладает над остальными, что обуславливает его выбор в качестве целевого вещества при разработке процедур определения аддуктов СИ с ДНК в биологических образцах.

Аддукты высокотоксичных веществ с макромолекулами (белками, ДНК) являются более ретроспективными биомаркерами экспозиции живых систем отравляющими веществами в сравнении с гидролитическими метаболитами. При этом использование аддуктов отравляющих веществ с биомолекулами в качестве аналитов в процедурах количественного анализа осложнено тем, что стандартные образцы таких аналитов пока коммерчески недоступны. В настоящей работе представлены результаты синтеза N7-НЕТЕГ — биомаркера генотоксического действия СИ, разработки процедуры его определения в моче и её апробации при анализе образцов мочи, полученных от экспонированных СИ крыс в эксперименте *in vivo*.

В моче аддукты находятся уже в депуринизированном виде за счёт внутренних процессов репарации ДНК организмом, поэтому стадии выделения ДНК и последующего её гидролиза можно избежать. Тем не менее для надёжной регистрации малых доз требуется пробоподготовка, связанная с концентрированием и очисткой.

2. Экспериментальная часть. Реактивы и материалы: сернистый иприт (ГСО 8248–2003), ацетонитрил (ТУ 6-09-5497–91), муравьиная кислота (ОСЧ, CAS 64-18-6), картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ) OASIS HLB, 60 мг (производство фирмы Waters, Украина), кат. № WAT094226.

Для синтеза использованы реактивы: гуанозин (Guanosine-5'-monophosphatedisodium (GMP), CAS 5550-12-9), дихлорметан (CAS 75-09-2, sigma-aldrich, кат. номер 650463-1L), 1,2-дихлорэтан (CAS 107-06-2, sigma-aldrich, кат. номер 284505-100ML), 2-меркаптоэтанол (CAS 60-24-2, sigma-aldrich, кат. номер M6250-100ML), натрий металлический (ГОСТ 3273–75), метанол (CAS 67-56-1, Merck, кат. номер 1060091000), диэтиловый эфир (ТУ 2600-001-43852015-10).

3. Синтез N7-[2-[(2-гидроксиэтил)тио]этил]-гуанина. 3.1. Синтез 2-(2-хлорэтилтио)этанола. 2-(2-хлорэтилтио)этанол является промежуточным продуктом, необходимым для синтеза N7-НЕТЕГ. Метод его получения приведён на рис. 1.

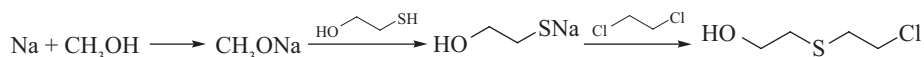


Рис. 1. Метод получения 2-(2-хлорэтилтио)этанола

Натрий (2,9 г, 0,125 ммоль) растворили в абсолютном метаноле (75 мл) под аргоном. Полученный раствор метилата натрия охладили до комнатной температуры и прилили к 2-меркаптоэтанолу (9 мл, 9,9 г, 0,125 ммоль) при перемешивании. Через 30 мин к реакционному раствору прилили 1,2-дихлорэтан (75 мл), перемешивали 5 мин, затем реакционную колбу поместили в холодильник (5°C). Через 24 ч осадок хлорида натрия отфильтровали, маточный раствор упарили в ротаторном испарителе при температуре

40°C. Остаток отмыли водой (40 мл), водную часть декантировали. Продукт растворяли в диэтиловом эфире (40 мл), сушили над сульфатом магния. Чистота и строение были подтверждены методами масс-спектрометрии и газовой хроматомасс-спектрометрии.

3.2. Синтез N7-HETEG. Метод получения конечного продукта N7-HETEG приведён на рис. 2.

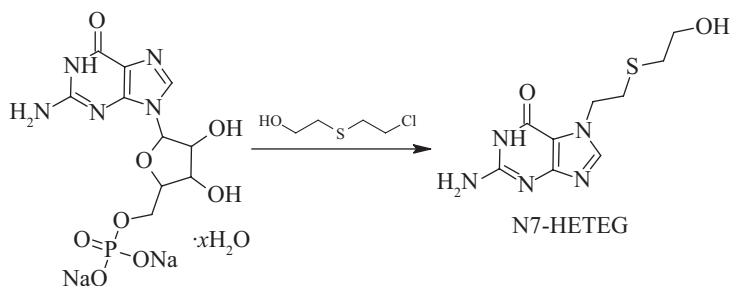


Рис. 2. Метод получения N7-HETEG

Аликвоту 2-(2-хлорэтилтио)этанола (0,245 ммоль) добавляли по каплям к суспензии гуанозин-5'-монофосфат-динатриевого соль-гидрату (0,2 г, 0,491 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (3 мл). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 3 ч, затем охлаждали до комнатной температуры. Осадок отфильтровали, маточный раствор упарили в роторном испарителе при 70°C. Остаток растворили в 5 мл 1М раствора HCl, промыли дихлорметаном (3 × 5 мл). Водную часть перемешивали при 100°C в течение 1,5 ч. Полученный раствор упарили, получили 40 мг жёлтого осадка. Подтверждение структуры и чистоты N7-HETEG проводили методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС).

Подтверждение структуры и чистоты синтезированного образца N7-HETEG. Синтезированный образец N7-HETEG растворили в деионизованной воде до концентрации 1 мкг/мл. Анализ раствора проводили методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием хроматомасс-спектрометрического приборного комплекса фирмы Thermo (США), состоящего из хроматографа модели DionexUltiMate 3000 и масс-спектрометра LTQOrbitrapVelos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении в режиме детектирования положительных ионов. Разделение выполняли на колонке Zorbax SB-C8 фирмы Agilent (США) (150 мм × 4,6 мм × 1,8 мкм). Условия хроматографического разделения: подвижная фаза — компонент А — 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде и компонент В — 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле категории «для градиентной ВЭЖХ»; соотношение компонентов подвижной фазы: 90% — А, 10% — В; режим хроматографического элюирования — изократический. Скорость потока элюента — 0,4 мл/мин; температура термостата колонки — 35°C; температура термостата отделения для проб — 5°C; объём ввода пробы 5,0 мкл; время анализа — 14 мин.

Условия работы масс-спектрометрического детектора: поток газа-осушителя — 45 у. е.; поток вспомогательного газа — 15 у. е.; температура газа-осушителя — 300°C; температура вспомогательного потока — 380°C; напряжение на капилляре — 3500 В. Детектирование в режиме сканирования по полному ионному току — в диапазоне $m/z = 50 \div 1000$.

На рис. 3 приведена ВЭЖХ-МС/МС-хроматограмма синтезированного образца N7-HETEG.

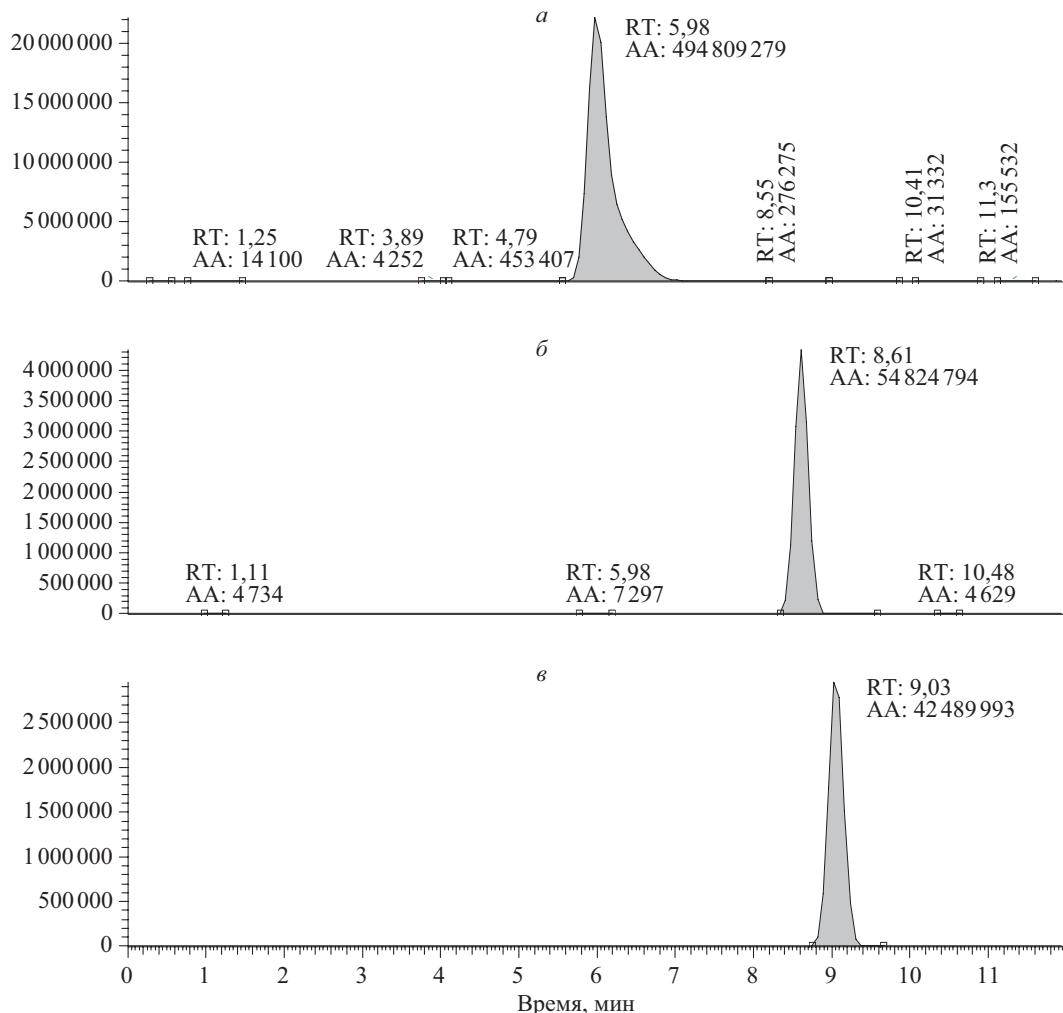


Рис. 3. ВЭЖХ-МС/МС-хроматограмма синтезированного образца N7-НЕТЕГ: а — примесь 1, $m/z = 152,0566$; б — N7-НЕТЕГ, $m/z = 256,0862 - [M + H]^+$; в — примесь 2, $m/z = 274,0502$; режим изократического элюирования, детектирование в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне $m/z = 50 \div 1000$ (полные условия описаны выше)

По данным ВЭЖХ-МС/МС-анализа, синтезированный образец N7-НЕТЕГ содержит примеси, элюирующиеся с колонки до (рис. 3, а) и после (рис. 3, в) основного вещества. Примесь А представляет собой непрореагировавший в реакции гуанин. Очистку синтезированного образца N7-НЕТЕГ от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ.

Очистка синтезированного образца N7-НЕТЕГ. Очистку синтезированного образца N7-НЕТЕГ от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ с использованием хроматомасс-спектрометра LCMS-2010 EV с масс-селективным детектором и детектором, диодная матрица (SPD-M20A) производства фирмы Shimadzu (Япония). Хроматографическая колонка и условия анализа были аналогичны описанным выше. Для подбора оптимального режима выделения целевого вещества в прибор ввели небольшой

объём образца (5 мкл); при этом идентификацию компонентов смеси проводили при помощи УФ-детектора и масс-спектрометра. Было установлено, что целевое соединение N7-НЕТЕГ, $m/z = 256$, элюируется с колонки в течение 7,75 мин, максимум поглощения был установлен при длине волны 260 нм. После подбора оптимальных условий разделения был отключён масс-спектрометрический детектор, а объём аликвоты пробы, вводимой в хроматограф, был увеличен до 100 мкл, сбор очищенной фракции осуществляли вручную. Было выполнено 15 вводов пробы и собрано около 6 мл элюата, содержащего N7-НЕТЕГ.

По данным ВЭЖХ-МС/МС-анализа, в результате очистки содержание примесей в образце по отношению к содержанию целевого вещества уменьшилось в 2000 раз. Образец N7-НЕТЕГ после очистки был высушен в ротаторном испарителе и использовался в дальнейших исследованиях в качестве аналитического стандарта с установленным содержанием основного вещества не менее 90%.

4. Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования N7-НЕТЕГ. **4.1. Определение характеристичных продукт-ионов.** Поскольку целью исследования была разработка процедуры определения аддукта СИ с ДНК в сложных биологических матрицах (моча, кровь и т. д.), идентификация по точным значениям масс не может обеспечить необходимой селективности. При работе с биологическими пробами предпочтительно определить один или несколько продукт-ионов, по которым осуществляется идентификация искомого аналита в смеси. Для определения продукт-ионов был выполнен ВЭЖХ-МС/МС-анализ водного раствора очищенного препарата N7-НЕТЕГ. В результате установлено, что в предлагаемых условиях регистрируется точное значение $m/z = 256,08627$, соответствующее иону $[M + H]^+$, и $m/z = 105,03690$, соответствующее продукт-иону. Предполагаемый механизм фрагментации и образования продукт-ионов N7-НЕТЕГ приведён на рис. 4.

5. Разработка методики определения N7-НЕТЕГ в моче. Разработанная методика включает в себя внесение внутреннего стандарта, концентрирование и очистку аналитов из пробы мочи методом ТФЭ на патронах Oasis HLB 60 мг, упаривание полученного экстракта досуха, последующее перерастворение в 100 мкл подвижной фазы и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС. Степень извлечения составила 60%.

На рис. 5 показан порядок подготовки пробы мочи для определения N7-НЕТЕГ, включающей ТФЭ на патронах Oasis HLB (62 мкг) и элюирование смесью ацетонитрил/вода 50/50 с добавкой 5%-го раствора муравьиной кислоты.

Для анализа полученных образцов использовали tandemный масс-спектрометр высокого разрешения LTQOrbitrapVelos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении и программным обеспечением Xcalibur для управления и обработки данных. Регистрацию аналита проводили по ионам $m/z = 256,08627$ (ион предшественник) и $m/z = 105,03690$ (продукт-ион); разрешение по массам — 70 000.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Agilent SB-C8 (150 мм × 4,6 мм × 1,8 мкм) в режиме градиентного элюирования.

Состав подвижной фазы: элюент А — $H_2O + 0,1\%$ -ный раствор $NaOH$, элюент Б — $CH_3CN + 0,1\%$ -ный раствор $NaOH$, скорость потока — 400 мкл/мин, температура термостата колонки — 35°C.

Установлен следующий режим элюирования: 0 мин — 90% А, 2 мин — 90% А, 7 мин — 10% А, 9 мин — 10% А, 9,1 мин — 90% А, 12 мин — 90% А. Время удерживания N7-НЕТЕГ — $6,0 \pm 0,1$ мин.

6. Результаты и их обсуждение. Для определения характеристичных ионов и подбора условий элюирования аддукта была приготовлена и проанализирована се-

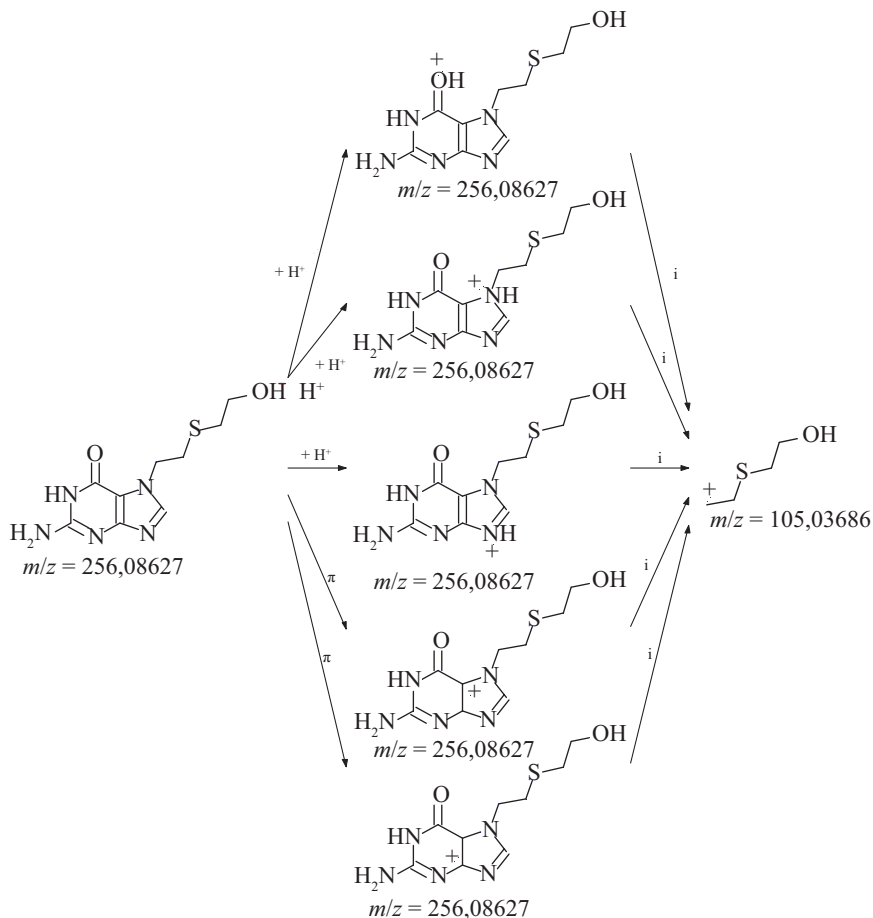


Рис. 4. Механизм фрагментации и образования продукт-ионов N7-НЕТЕГ

Oasis HLB (3 мл, 62 мг)
 ↓
 1 мл ацетонитрила, 2 мл воды
 ↓
 1 мл мочи
 ↓
 1 мл 10%-го раствора ацетонитрила (промывка патрона)
 ↓
 Элюирование аддуктов: 1,5 мл ацетонитрила (v/v) в 5%-м растворе муравьиной кислоты (v/v)
 ↓
 Упаривание элюата досуха при 65°C
 ↓
 Перерастворение сухого остатка в 10%-м растворе ацетонитрила (100 мкл)
 ↓
 Перемешивание и последующее центрифугирование в течение 10 мин при 14 000 об/мин
 ↓
 Анализ супернатанта ВЭЖХ-МС/МС

Рис. 5. Порядок подготовки проб

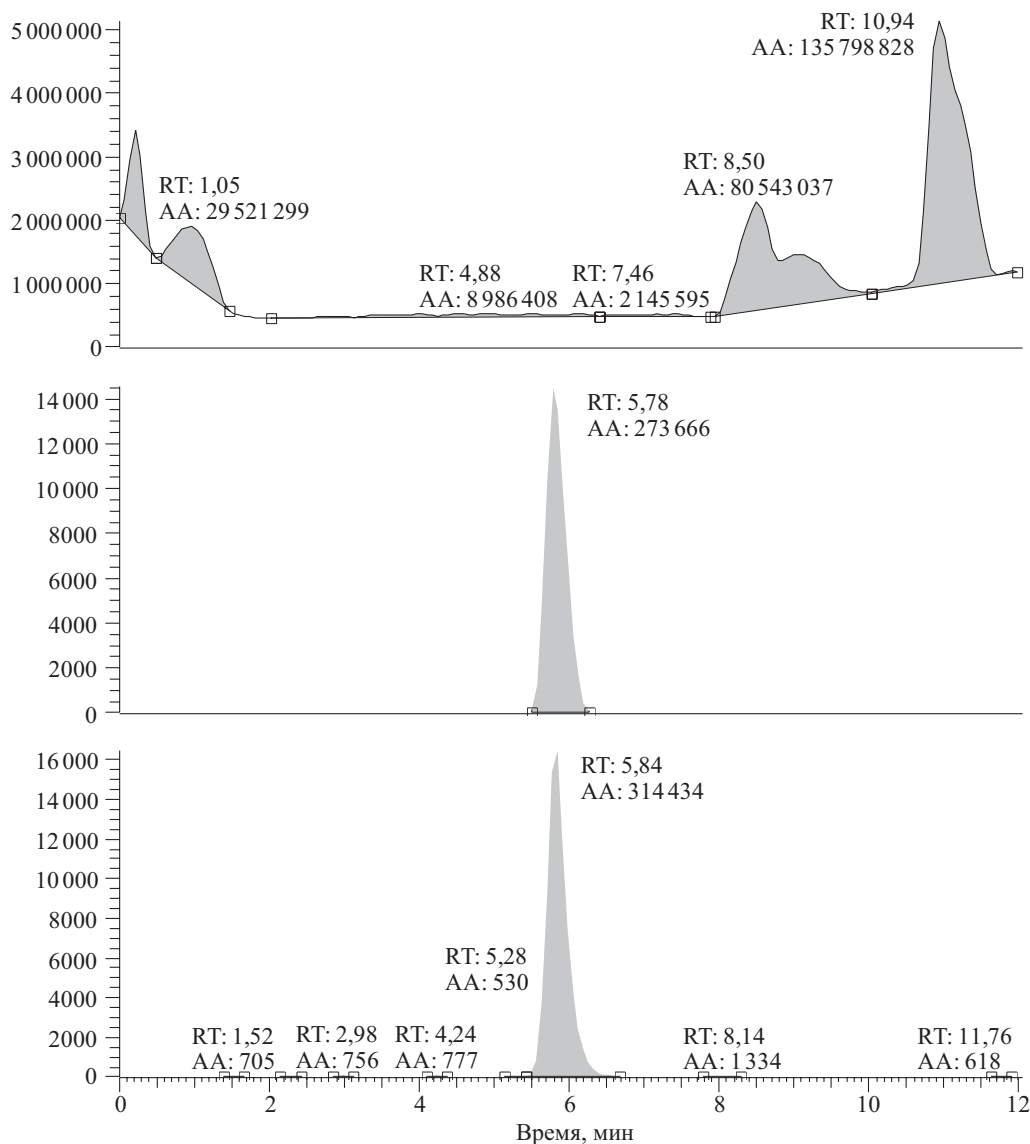


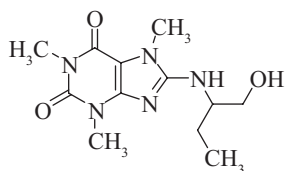
Рис. 6. Масс-хроматограмма стандартного раствора N7-НЕТЕГ 10 нг/мл в воде:
 режим градиентного элюирования, регистрацию аналита проводили
 по ионам $m/z = 256,08627$ (ион-предшественник) и $m/z = 105,03690$
 (продукт-ион); разрешение по массам — 70 000 (полные условия анализа см. выше)

рия растворов N7-НЕТЕГ в деионизованной воде с концентрацией от 1 мкг/мл до 10 нг/мл. На рис. 6 приведена масс-хроматограмма стандартного раствора с концентрацией 10 нг/мл.

Как видно из масс-хроматограммы, соединение имеет чёткие пики иона-предшественника с $m/z = 256,08627$ (рис. 6, б) и продукт-иона с $m/z = 105,03690$ (рис. 6, в).

При анализе бланковой мочи, содержащей искусственные добавки N7-НЕТЕГ в различных концентрациях, было установлено, что на площадь пика иона-предшественника

существенно влияют матричные эффекты. Таким образом, для получения достоверных результатов необходимо проводить расчёты только по площади пика продукт-иона и использовать нормировку по внутреннему стандарту. В качестве последнего использован синтезированный канд. хим. наук В. А. Кузнецовым 8-(1-гидроксипутан-2-иламино)-1,3,7-триметил-1-пурин-2,6(3H,7H). Это заведомо экзогенное соединение обладает схожим с целевым веществом строением и даёт чёткие характеристичные пики в масс-спектре. Структурная формула и название внутреннего стандарта по системе ИЮПАК приведены на рис. 7.



Химическая формула: $C_{12}H_{19}N_5O_3$
 m/z : 281,14879
 ИЮПАК: 8-(1-hydroxybutan-2-ylamino)-
 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione

Рис. 7. Структурная формула внутреннего стандарта и его название по системе ИЮПАК

На рис. 8 приведена масс-хроматограмма пробы мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ и внутреннего стандарта в концентрациях 1 нг/мл.

Отметим, что регистрация пика иона-предшественника не может однозначно доказывать воздействие СИ, поскольку имеют место значительные матричные влияния.

7. Построение градуировочного графика. Для получения градуировочной характеристики была приготовлена и проанализирована серия проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ с концентрациями 1, 10, 100 нг/мл и добавкой внутреннего стандарта с концентрацией 1 нг/мл. На основании полученных данных были вычислены относительные площади пика N7-НЕТЕГ и построен график зависимости относительной площади пика от концентрации (рис. 9).

8. Результаты токсикологического эксперимента *in vivo*. Для апробации разработанной методики был проведён токсикологический эксперимент с подкожным введением СИ анестезированным крысам в дозе $\frac{1}{4}LD_{50}$.

Мочу крыс отбирали с использованием метаболических камер через 2, 3, 7, 14 и 21 сут после воздействия СИ. Полученные пробы анализировали согласно разработанной методике. Результаты приведены в таблице.

Диаграмма на рис. 10 иллюстрирует кинетику выведения N7-НЕТЕГ с мочой.

Матричный фактор, нормализованный на внутренний стандарт, определяемый соотношением матричных факторов

аналита и внутреннего стандарта, составляет 12%. Нижний предел определения аналита в моче — 1 нг/мл. Относительная ошибка определения ($n = 2$) — менее 30%.

В настоящей работе подтверждена возможность доказательно установить факт воздействия СИ на организм путём идентификации аддукта СИ с ДНК в моче крыс. Развитие аналитических технологий количественного определения аддуктов алкилирующих агентов с ДНК в моче чрезвычайно важно в целях терапевтического мониторинга лекарственных средств, используемых при химиотерапии. Известно, что повреждающее воздействие этих препаратов на ДНК даже при успешном лечении может инициировать новый онкологический процесс [13]. Индивидуальный подбор дозы с учётом результатов

Таблица

Результаты количественного
определения N7-НЕТЕГ в моче крыс,
экспонированных СИ дозой $\frac{1}{4}LD_{50}$

Время, сут	Концентрация N7-НЕТЕГ, нг/мл
2	172 ± 52
3	35 ± 11
7	40 ± 12
14	5 ± 2
21	< 1

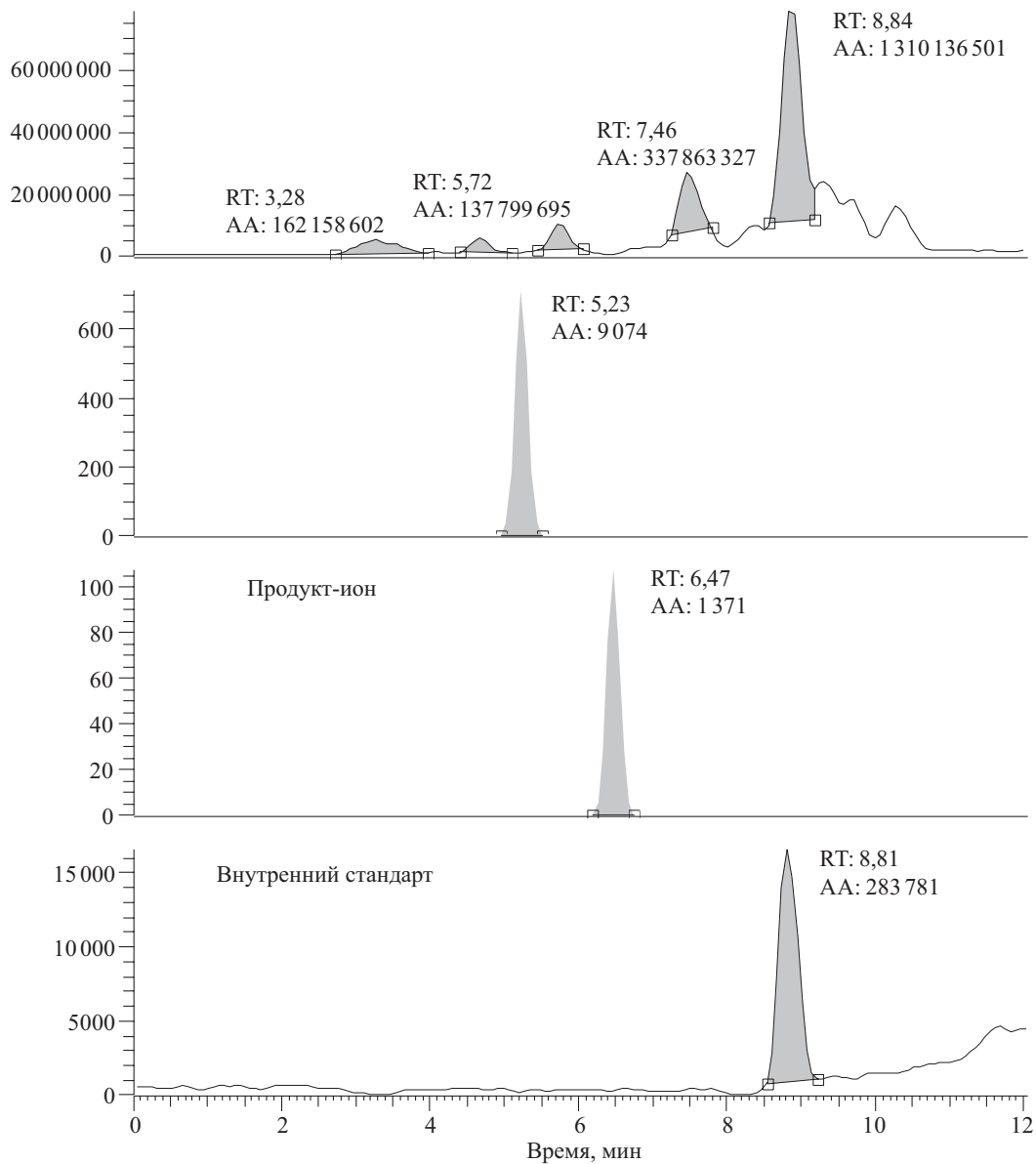


Рис. 8. Масс-хроматограмма пробы мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ внутреннего стандарта в концентрациях 1 нг/мл:
режим градиентного элюирования, регистрацию аналита проводили по ионам $m/z = 256,08627$ (ион-предшественник) и $m/z = 105,03690$ (продукт-ион); разрешение по массам — 70 000 (полные условия анализа см. выше)

мониторинга концентраций аддуктов используемых препаратов с ДНК в моче позволит минимизировать риск лекарственного канцерогенеза в онкологии.

Заключение. Синтезирован стандарт аддукта сернистого иприта с ДНК N7-НЕТЕГ. После очистки содержание основного вещества в стандартном образце составило 90%. Разработана методика определения основного продукта взаимодей-

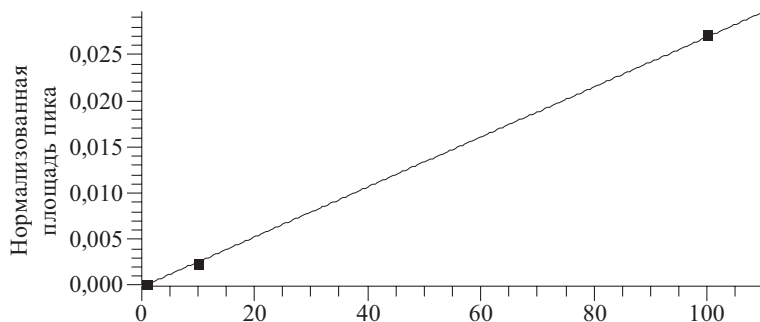


Рис. 9. Градуировочный график зависимости нормализованной площади пика N7-НЕТЕГ от концентрации:

$$Y = -0,000177995 + 0,000270881X; R^2 = 0,9996; W: 1/Y$$

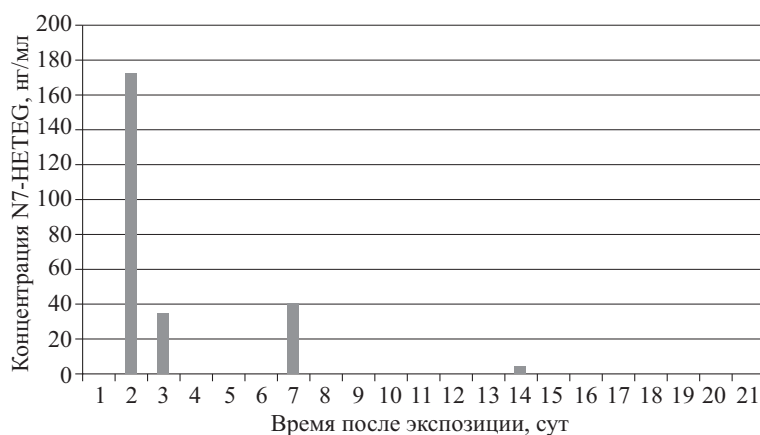


Рис. 10. График зависимости содержания N7-НЕТЕГ в моче крыс от времени после экспозиции СИ

ствия СИ с ДНК в моче крыс, подобраны условия очистки пробы, хроматографического разделения, определены характеристичные ионы для масс-спектрометрического детектирования.

В результате токсикологического эксперимента установлена возможность определения N7-НЕТЕГ в моче крыс в течение 7 сут после подкожного введения СИ в несмертельной дозе.

Следует отметить важность использования внутреннего стандарта, так как матричные влияния могут на порядки корректировать значения площадей пиков аналита.

Литература

1. Smith J. R., Capacio B. R., Korte W. D. Analysis for plasma protein biomarkers following an accidental human exposure to sulfur mustard // J. Anal. Toxicol. 2008. Vol. 32. P. 17–24.
2. Noort D., Fidder A., Degenhardt-Langelaan C. E., Hulst A. G. Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an in vivo study // J. Anal. Toxicol. 2008. Vol. 32. P. 25–30.
3. Benshop H. P., van der Schans G. P., Noort D. Verification of exposure to sulfur mustard in two casualties of the Iran-Iraq conflict // J. Anal. Toxicol. 1997. Vol. 21. P. 249–251.

4. Tarantini A., Maitreb A., Lefebvre E., Marques M., Marie C. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures // *Mutat. Res.* 2009. Vol. 671. P. 67–75.
5. Martinez G. R., Loureiro A. P. M., Marques S. A., Miyamoto S., Yamaguchi L. F. Oxidative and alkylating damage in DNA // *Mutat. Res.* 2003. Vol. 544. P. 115–127.
6. Garner R. C. The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis // *Mutat. Res.* 1998. Vol. 402. P. 67–75
7. Brookes P., Lawley P. D. Reaction of mustard gas with nucleic acids *in vitro* and *in vivo* // *Biochemical J.* 1960. Vol. 77. P. 478–484.
8. Brookes P., Lawley P. D. Effects of alkylating agents on T2 and T4 bacteriophages // *Biochemical J.* 1963. Vol. 89. P. 138–144.
9. Lawley P. D., Brookes P. Further studies on alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides // *Biochemical J.* 1963. Vol. 89. P. 127–138.
10. Zhang Y., Nie Z., Chen J., Guo L., Wu B. et al. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. (B)*. 2014. Vol. 961. P. 29–35.
11. Kehe K., Balszuweit F., Steinritz D., Thiermann H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering // *Toxicology*. 2009. Vol. 263. P. 12–19.
12. Boysen G., Pachkowski B. F., Nakamura J., Swenberg J. A. The formation and biological significance of N7-guanine adducts // *Mutat. Res.* 2009. Vol. 678. P. 76–94.
13. Белицкий Г. А., Лесовая Е. А., Кирсанов К. И., Якубовская М. Г. Вторые первичные опухоли у онкологических больных: лекарственный канцерогенез в онкологии // *Усп. молекуляр. онкологии*. 2016. Т. 3. С. 44–55.

References

1. Smith J. R., Capacio B. R., Korte W. D. Analysis for plasma protein biomarkers following an accidental human exposure to sulfur mustard. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, vol. 32, pp. 17–24.
2. Noort D., Fidder A., Degenhardt-Langelaan C. E., Hulst A. G. Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an *in vivo* study. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, vol. 32, pp. 25–30.
3. Benschop H. P., van der Schans G. P., Noort D. Verification of exposure to sulfur mustard in two casualties of the Iran-Iraq conflict. *J. Anal. Toxicol.*, 1997, vol. 21, pp. 249–251.
4. Tarantini A., Maitreb A., Lefebvre E., Marques M., Marie C. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat. Res.*, 2009, vol. 671, pp. 67–75.
5. Martinez G. R., Loureiro A. P. M., Marques S. A., Miyamoto S., Yamaguchi L. F. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat. Res.*, 2003, vol. 544, pp. 115–127.
6. Garner R. C. The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 1998, vol. 402, pp. 67–75.
7. Brookes P., Lawley P. D. Reaction of mustard gas with nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical J.*, 1960, vol. 77, pp. 478–484.
8. Brookes P., Lawley P. D. Effects of alkylating agents on T2 and T4 bacteriophages. *Biochemical J.*, 1963, vol. 89, pp. 138–144.
9. Lawley P. D., Brookes P. Further studies on alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochemical J.*, 1963, vol. 89, pp. 127–138.
10. Zhang Y., Nie Z., Chen J., Guo L., Wu B. et al. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. (B)*, 2014, vol. 961, pp. 29–35.
11. Kehe K., Balszuweit F., Steinritz D., Thiermann H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology*, 2009, vol. 263, pp. 12–19.
12. Boysen G., Pachkowski B. F., Nakamura J., Swenberg J. A. The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat. Res.*, 2009, vol. 678, pp. 76–94.
13. Belitsky G. A., Lesovaya E. A., Kirsanov K. I., Yakubovskaya M. G. Vtorye pervichnye opukholi u onkologicheskikh bol'nykh: lekarstvennyi kantserogenez v onkologii [Second primary tumors in cancer patients: drug carcinogenesis in oncology]. *Uspekhi molekuliarnoi onkologii* [Advances in Molecular Oncology], 2016, vol. 3, pp. 44–55. (In Russian)

Статья поступила в редакцию 11 апреля 2017 г.

Контактная информация

Орлова Ольга Игоревна — e-mail: orlola@mail.ru

Каракашев Георгий Васильевич — кандидат биологических наук.

Шмурак Владимир Игоревич.

Абзианидзе Виктория Владимировна — кандидат химических наук.

Савельева Елена Игоревна — кандидат химических наук.

Orlova O. I. — e-mail: orlola@mail.ru

Karakashev G. V. — PhD.

Shmurak V. I.

Abzianidze V. V. — PhD.

Savelieva E. I. — PhD.